

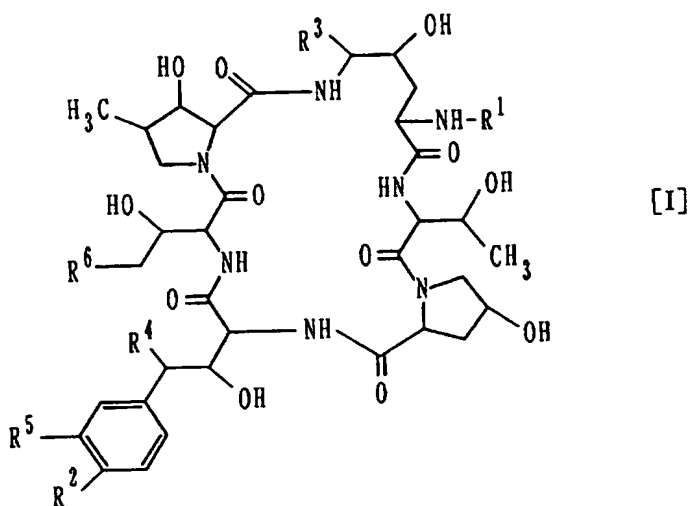


<p>(51) 国際特許分類6 C12N 9/80</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO97/32975</p> <p>(43) 国際公開日 1997年9月12日(12.09.97)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP97/00692</p> <p>(22) 国際出願日 1997年3月6日(06.03.97)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平8/51386 1996年3月8日(08.03.96) JP 特願平8/194207 1996年7月24日(24.07.96) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 藤沢薬品工業株式会社 (FUJISAWA PHARMACEUTICAL CO., LTD.)[JP/JP] 〒541 大阪府大阪市中央区道修町3丁目4番7号 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 上田 聡(UEDA, Satoshi)[JP/JP] 〒490-11 愛知県海部郡菰目寺町大字菰目寺字権現79 Aichi, (JP) 田中美穂(TANAKA, Miho)[JP/JP] 〒300 茨城県土浦市中村南6-5-5-306 Ibaraki, (JP) 江崎正美(EZAKI, Masami)[JP/JP] 〒305 茨城県つくば市下広岡410-150 Ibaraki, (JP) 坂本憲俊(SAKAMOTO, Kazutoshi)[JP/JP] 〒300 茨城県土浦市乙戸南2-17-14 Ibaraki, (JP)</p>		<p>橋本正治(HASHIMOTO, Seiji)[JP/JP] 〒305 茨城県つくば市大角豆1194-1 Ibaraki, (JP) 大畑暢敏(OOHATA, Nobutaka)[JP/JP] 〒492 愛知県稲沢市国府宮1-7-34-401 Aichi, (JP) 坪井 勝(TSUBOI, Masaru)[JP/JP] 〒492 愛知県稲沢市北島町神明前1-24 Aichi, (JP) 山下道雄(YAMASHITA, Michio)[JP/JP] 〒305 茨城県つくば市並木3-11-11 Ibaraki, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 関 英男(SEKI, Hideo) 〒532 大阪府大阪市淀川区加島2丁目1番6号 藤沢薬品工業株式会社 大阪工場内 Osaka, (JP)</p> <p>(81) 指定国 CA, CN, JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>
<p>(54) Title: PROCESS FOR THE DEACYLATION OF CYCLIC LIPOPEPTIDES</p> <p>(54) 発明の名称 環状リポペプチド物質の脱アシル化法</p> <div data-bbox="552 1176 1185 1680"> <p style="text-align: right;">(I)</p> </div> <p>(57) Abstract A cyclic lipopeptide acylase which can effectively remove an acyl side chain from a cyclic lipopeptide, specifically FR901379 represented by general formula (I) or an analogue thereof; and a process for the preparation of a cyclic peptide with the acylase, wherein R¹ is acyl, R² is hydroxy or acyloxy, R³ is hydrogen or hydroxy, R⁴ is hydrogen or hydroxy, R⁵ is hydrogen or hydroxysulfonyloxy, and R⁶ is hydrogen or carbamoyl.</p>		

(57) 要約

環状リポペプチド物質、具体的には、下記一般式 [I] で示されるFR901379物質及びその類似体のアシル側鎖を効果的に脱アシル化し得る環状リポペプチドアシラーゼ、ならびに、該アシラーゼを使用した環状ペプチド物質の製造法を提供する。

一般式 [I] :



[式中、R¹ はアシル基、
R² はヒドロキシ基またはアシルオキシ基、
R³ は水素またはヒドロキシ基、
R⁴ は水素またはヒドロキシ基、
R⁵ は水素またはヒドロキシスルホニルオキシ基、および
R⁶ は水素またはカルバモイル基
を意味する]

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を特定するために使用されるコード

AL	アルバニア	ES	スペイン	LR	リベリア	RU	ロシア連邦
AM	アルメニア	EE	エストニア	LS	レソト	RS	セルビア
AT	オーストリア	FR	フランス	LT	リトアニア	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	IR	イラン	LV	ラトヴィア	SK	スロバキア
AZ	アゼルバイジャン	BA	ボスニア	MC	モナコ	SN	セネガル
BB	バルバドス	BE	ベルギー	MD	モルドバ	SS	ス威士ランド
BF	ブルキナファソ	BG	ブルガリア	MG	マダガスカル	ST	サントメ・プリンシペ
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MK	マケドニア	TD	チャド
BZ	ベリーズ	HN	ホンデュラス	ML	マリ	TG	トーゴ
CA	カナダ	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	TM	トルクメニスタン
CC	中東	IT	イタリア	MM	ミャンマー	TR	トルコ
CD	コンゴ民主共和国	JP	日本	MN	モンゴル	TT	トリニダード・トバゴ
CE	コートジボワール	KE	ケニア	MX	メキシコ	UA	ウクライナ
CH	スイス	KR	韓国	NE	ニジェール	UG	ウガンダ
CI	コート・ジボワール	KZ	カザフスタン	NL	オランダ	US	米国
CM	コンゴ民主共和国	KG	キルギスタン	NO	ノルウェー	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	LA	ラオス	NZ	ニュージーランド	UY	ウルグアイ
CO	コロンビア	LC	セント・ルシア	PT	ポルトガル		
DE	ドイツ			RO	ルーマニア		

明 細 書

環状リポペプチド物質の脱アシル化法

技術分野

本発明は、酵素技術に関するものである。

具体的には、本発明は環状リポペプチド物質のアシル側鎖を脱アシル化する新規なアシラーゼ、ならびに、それを用いた脱アシル化法に関するものである。

さらに具体的には、本発明は、微生物*Coleophoma* sp. F-11899株 (FERM BP-2635) によって生産される、FR901379物質 (特開平 3-184921号公報に記載) 及びFR901379物質の類似体のアシル側鎖を脱アシル化する新規なアシラーゼ、ならびにそれを用いた脱アシル化法に関するものである。

背景技術

環状リポペプチド物質、具体的には、上記のFR901379物質及びその類似体のアシル側鎖を効果的に脱アシル化し得るアシラーゼが求められていた。

発明の開示

本発明の発明者らは、FR901379物質及びEchinocandin B, Aculeacin A等のFR901379物質類似体に代表される環状リポペプチド物質のアシル側鎖を脱アシル化する新規なアシラーゼを求めて鋭意研究を行った。その結果、微生物*Streptomyces anulatus*が生産するアシラーゼを新たに見出し、目的とする脱アシル化を効果的に行うことに成功した。

この新規環状リポペプチドアシラーゼならびに、これを用いた脱アシル化法の特徴を以下の説明で、明らかにする。

まず、本発明の環状リポペプチドアシラーゼ生産菌につき説明する。

新規環状リポペプチドアシラーゼ生産菌は具体的には、例えば*Streptomyces*属に属する*Streptomyces anulatus* No.4811株、*Streptomyces anulatus* No.8703株かあるいは*Streptomyces* sp.6907株である。

以下、これらの菌株の特徴を示す。

新規環状リポペプチドアシラーゼ生産菌である *Streptomyces anulatus* No. 4811株と名付けた菌株（以下、No. 4811株と略称する）は、福島県で採取された土壌試料から新しく分離されたものである。以下にNo. 4811株の菌学的性質を示す。

種々の培地上での特徴

表 1 に、No. 4811株を酵母エキス・麦芽エキス寒天、オートミール寒天、無機塩・でんぷん寒天、グリセリン・アスパラギン寒天、ペプトン・酵母エキス・鉄寒天およびチロシン寒天培地上、30℃で14日間培養した時の発育状態を光学および走査型電子顕微鏡で観察した特徴をまとめた。色名はMethuen Handbook of Colour, Methuen, London, 1978を使用した。

表1 No. 4811株の各種培地における培養上の特徴

培 地	培養性状
酵母エキス・麦芽エキス寒天 (ISP-2)	G:良好 A:豊富、黄味灰色(2B2) R:茶色(7F4) S:少量、茶色
オートミール寒天 (ISP-3)	G:良好普通 A:豊富、黄味灰色(2C3) R:茶色(7F4) S:微量、茶色
無機塩・でんぷん寒天 (ISP-4)	G:良好 A:豊富、黄味灰色(2C3) R:黄味茶色(5E4) S:なし
グリセリン・アスパラギン 寒天 (ISP-5)	G:良好 A:豊富、黄味灰色(2C3) R:茶色(6E4) S:なし
ペプトン・酵母エキス・ 鉄寒天 (ISP-6)	G:普通 A:貧弱、白色 R:明るい茶色(6D5) S:なし
チロシン寒天 (ISP-7)	G:普通 A:普通、黄味灰色(2B2) R:茶色(7F4) S:なし

略号; G:生育 A:気菌糸 R:生育裏面の色 S:可溶性色素

気菌糸の色は黄味灰から緑灰、生育裏面の色は黄味茶から茶、可溶性色素は薄い茶色、菌体内色素および可溶性色素はpH感受性ではない。メラノイド色素の産生は見られなかった。

生理学的特徴

表 2 に No. 4811 株の生理学的特徴をまとめた。

表 2 No. 4811 株の生理学的特徴

条 件	性 質
生育温度範囲	4.0 - 35.0℃
ゼラチン液化	+
ミルク凝固	±
ミルクペプトン化	+
澱粉分解	+
メラノイド色素産生	-
炭素源利用性	
D-グルコース	+
L-アラビノース	+
D-キシロース	+
イノシトール	-
マンニトール	+
D-フラクトース	+
L-ラムノース	±
シュクロース	-
ラフィノース	-

+: 陽性、±: 擬陽性、-: 陰性

No. 4811 株の基生菌糸はよく発達し、不規則に分枝するが、断裂しない。基生菌糸から伸長した気菌糸は単純分枝し、長い孢子鎖を形成する。気菌糸の形は、直状、曲状でプリドハムら (Pridham, T.G., et al.: Appl. Microbiol. 6:54, 1958) 等の分類の RF タイプに属する。1つの孢子連鎖は20個以上の孢子からなる。孢子は表面が平滑で、 $0.5 \sim 0.7 \times 0.7 \sim 1.1 \mu\text{m}$ の大きさの円筒型であった。

菌核、孢子のう、遊走子は観察されなかった。

細胞壁タイプ

細胞壁のアミノ酸はベッカーら (Becker, B., M. P. Lechevalier, R. E. Gordon and H. A. Lechevalier: Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of whole-cell hydrolysates: *Appl. Microbiol.* 12: 421-423, 1964)

山口 (Yamaguchi, T.: Comparison of the cell wall composition of morphologically distinct actinomycetes: *J. Bacteriol.* 89: 444-453, 1965) 等の方法に従い、全菌体分解物の分析の結果、LL-ジアミノピメリン酸の存在が確認できた。従って本菌株の細胞壁タイプはI型と考えられる。

以上の形態観察および化学分析の結果からNo. 4811株はプリドハムら (Pridham, T. G. et al: *Appl. Microbiol.* 6: 54, 1958) の分類に従えば、*Streptomyces* 属に属すると考えられる。そこで本菌株を文献、シャーリングら (Shirling, E. B. and D. Gottlieb: Cooperative description of type culture of *Streptomyces*. 2. Species descriptions from first study. *Intern. J. Syst. Bacteriol.* 18: 69-189, 1968 ;

Shirling, E. B. and D. Gottlieb: Cooperative description of type culture of *Streptomyces*. 3. Additional species descriptions from first and second studies. *Intern. J. Syst. Bacteriol.* 18: 279-392, 1968 ;

Shirling, E. B. and D. Gottlieb: Cooperative description of type culture of *Streptomyces*. 4. Species descriptions from second, third and fourth studies. *Intern. J. Syst. Bacteriol.* 19: 391-512, 1969) 、スカーマンら (Skerman, V. B., V. McGowan and P. H. A. Sneath: Approved list of bacterial names. Amended Edition. American Society for Microbiology, Washington, D. C., 1989、および、ムーアら、 (Moore, W. E., E. P. Cato and L. V. H. Moore: Index of bacterial and Yeast Nomenclatural Changes. American Society for Microbiology, Washington, D. C., 1992)

に記載された *Streptomyces* 属の種と比較した。その結果、*Streptomyces anulatus* の記載上の性質と本株の性質はほとんど同一であった。以上のことから

らNo.4811株を*Streptomyces anulatus*と同定し、*Streptomyces anulatus* No.4811と命名した。

この*Streptomyces anulatus* No.4811株は通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所、(〒305 茨城県つくば市東1-1-3)にFERM P-15377として平成7年12月27日に寄託され、さらにFERM BP-5808として平成9年2月3日にブダペスト条約に基づく寄託へ移管されている。

新規環状リボペプチドアシラーゼ生産菌である*Streptomyces anulatus* No.8703株と名付けた菌株(以下、No.8703株と略称する)は、福島県で採取された土壌試料から新しく分離されたものである。以下にNo.8703株の菌学的性質を示す。

種々の培地上での特徴

表3に、No.8703株を酵母エキス・麦芽エキス寒天、オートミール寒天、無機塩・でんぷん寒天、グリセリン・アスパラギン寒天、ペプトン・酵母エキス・鉄寒天およびチロシン寒天培地上、30℃で14日間培養した時の発育状態を光学および走査型電子顕微鏡で観察した特徴をまとめた。色名はMethuen Handbook of Colour, Methuen, London, 1978を使用した。

表3 No. 8703株の各種培地における培養上の特徴

培 地	培養性状
酵母エキス・麦芽エキス寒天 (ISP-2)	G:良好 A:豊富、黄味灰色(2B2) R:灰茶色(5F4) S:なし
オートミール寒天 (ISP-3)	G:普通 A:豊富、黄味灰色(2C3) R:灰茶色(4C4) S:なし
無機塩・でんぷん寒天 (ISP-4)	G:良好 A:豊富、黄味灰色(2C3) R:暗灰色(1F6) S:なし
グリセリン・アスパラギン 寒天 (ISP-5)	G:良好 A:豊富、黄味灰色(2C3) R:オリーブ茶色(4E5) S:なし
ペプトン・酵母エキス・ 鉄寒天 (ISP-6)	G:普通 A:貧弱、白色 R:黄味茶色(5D5) S:なし
チロシン寒天 (ISP-7)	G:普通 A:普通、黄味灰色(2B2) R:茶色(7F4) S:なし

略号; G:生育 A:気菌糸 R:生育裏面の色 S:可溶性色素

気菌糸の色は黄味灰から緑灰、生育裏面の色は黄味茶から茶、可溶性色素は薄い茶色、菌体内色素および可溶性色素はpH感受性ではない。メラノイド色素の産生はトリプトン・酵母エキスパロス、ペプトン・酵母エキス・鉄寒天及びチロシン寒天でみられた。

生理学的特徴

表4にNo. 8703株の生理学的特徴をまとめた。

表4 No. 8703株の生理学的特徴

条 件	性 質
生育温度範囲	4.0 - 35.0℃
ゼラチン液化	+
ミルク凝固	±
ミルクペプトン化	+
澱粉分解	+
メラノイド色素産生	-
炭素源利用性	
D-グルコース	+
L-アラビノース	+
D-キシロース	+
イノシトール	-
マンニトール	+
D-フラクトース	+
L-ラムノース	+
シュクロース	-
ラフィノース	-

+: 陽性、±: 擬陽性、-: 陰性

この菌株はイノシトール、シュクロースおよびラフィノースを利用できなかった。ミルクをペプトン化できた。生育温度範囲については、4.0-35℃であった。

No.8703株の基生菌糸はよく発達し、不規則に分枝するが断裂しない。基生菌糸から伸長した気菌糸は単純分枝し、長い孢子鎖を形成する。気菌糸の形は、直状、曲状でプリドハムら (Pridham, T.G., et al.: Appl. Microbiol. 6:54, 1958)

等の分類のRFタイプに属する。1つの孢子連鎖は20個以上の孢子からなる。孢子は表面が平滑で、円筒型であった。孢子の大きさは $0.5-0.8 \times 0.6-1.1 \mu m$ であった。菌核、孢子囊、遊走子は観察されなかった。

細胞壁タイプ

細胞壁のアミノ酸はベッカーら (Becker, B., M. P. Lechevalier, R. E. Gordon and H. A. Lechevalier: Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of whole-cell hydrolysates: Appl. Microbiol. 12:421-423, 1964)

山口 (Yamaguchi, T.: Comparison of the cell wall composition of morphologically distinct actinomycetes: J. Bacteriol. 89:444-453, 1965) 等の方法に従い、全菌体分解物の分析の結果、LL-ジアミノピメリン酸の存在が確認できた。従って本菌株の細胞壁タイプはI型と考えられる。

以上の形態観察および化学分析の結果からNo. 8703株はプリドハムら (Pridham, T. G. et al: Appl. Microbiol. 6:54, 1958) の分類に従えば、*Streptomyces* 属に属すると考えられる。そこで本菌株を文献、シャーリングら (Shirling, E. B. and D. Gottlieb: Cooperative description of type culture of *Streptomyces*. 2. Species descriptions from first study. Intern. J. Syst. Bacteriol. 18:69-189, 1968 ; Shirling, E. B. and D. Gottlieb: Cooperative description of type culture of *Streptomyces*. 3. Additional species descriptions from first and second studies. Intern. J. Syst. Bacteriol. 18:279-392, 1968 ; Shirling, E. B. and D. Gottlieb: Cooperative description of type culture of *Streptomyces*. 4. Species descriptions from second, third and fourth studies. Intern. J. Syst. Bacteriol. 19:391-512, 1969) 、スカーマンら (Skerman, V. B., V. McGowan and P. H. A. Sneath: Approved list of bacterial names. Amended Edition. American Society for Microbiology, Washington, D. C., 1989, および、ムーアら、(Moore, W. E., E. P. Cato and L. V. H. Moore: Index of

bacterial and Yeast Nomenclatural Changes. American Society for Microbiology, Washington, D. C., 1992)

に記載された *Streptomyces* 属の種と比較した。その結果、*Streptomyces anulatus* の記載上の性質と本株の性質はほとんど同一であった。以上のことから No. 8703 株を *Streptomyces anulatus* と同定し、*Streptomyces anulatus* No. 8703 と命名した。

この *Streptomyces anulatus* No. 8703 株は通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所、(〒305 茨城県つくば市東 1-1-3) に FERM P-15507 として平成 8 年 3 月 8 日に寄託され、さらに FERM BP-5810 として平成 9 年 2 月 3 日にブダペスト条約に基づく寄託へ移管されている。

新規環状リボペプチドアシラーゼ生産菌である *Streptomyces* sp. No. 6907 株と名付けた菌株 (以下 No. 6907 株と略称する) は、福島県で採取された土壌試料から新しく分離されたものである。以下に No. 6907 株の菌学的性質を示す。

種々の培地上での特徴

表 5 に、No. 6907 株を酵母エキス・麦芽エキス寒天、オートミール寒天、無機塩・でんぷん寒天、グリセリン・アスパラギン寒天、ペプトン・酵母エキス・鉄寒天およびチロシン寒天培地上、30℃ で 14 日間培養した時の発育状態を光学および走査型電子顕微鏡で観察した特徴をまとめた。色名は Methuen Handbook of Colour, Methuen, London, 1978 を使用した。

表5 No. 6907株の各種培地における培養上の特徴

培 地	培養性状
酵母エキス・麦芽エキス寒天 (ISP-2)	G:良好 A:豊富、黄味灰色(白4A2) R:灰味橙色(5B6) S:なし
オートミール寒天 (ISP-3)	G:普通 A:豊富、青味灰色(22C2) R:明るい茶色(4D4) S:なし
無機塩・でんぷん寒天 (ISP-4)	G:良好 A:豊富、青味灰色(19C2) R:茶色(6F4) S:なし
グリセリン・アスパラギン 寒天 (ISP-5)	G:良好 A:豊富、青味灰色(22B2) R:赤味茶色(8E4) S:なし
ペプトン・酵母エキス・ 鉄寒天 (ISP-6)	G:普通 A:なし R:灰味茶色(9F3) S:褐色
チロシン寒天 (ISP-7)	G:良好 A:普通、黄味白色(4A2) R:暗いマゼンダ色(13F3) S:褐色

略号; G:生育 A:気菌糸 R:生育裏面の色 S:可溶性色素

気菌糸の色は黄味灰から青味灰、生育裏面の色は明るい茶から茶、菌体内色素はpH感受性ではない。メラノイド色素の産生はトリプトン・酵母エキスパロス、ペプトン・酵母エキス・鉄寒天及びチロシン寒天でみられた。

生理学的特徴

表 6 にNo. 6907株の生理学的特徴をまとめた。

表 6 No. 6907株の生理学的特徴

条 件	性 質
生育温度範囲	9.0 - 40.0℃
ゼラチン液化	+
ミルク凝固	+
ミルクペプトン化	-
澱粉分解	+
メラノイド色素産生	+
炭素源利用性	
D-グルコース	+
L-アラビノース	+
D-キシロース	+
イノシトール	+
マンニトール	+
D-フラクトース	+
L-ラムノース	+
シュクロース	+
ラフィノース	+

+: 陽性、±: 擬陽性、-: 陰性

この菌株は試験したすべての炭素源を利用できた。ミルクのペプトン化はできなかった。生育温度範囲については、9.0-40.0℃であった。

No. 6907株の基生菌糸はよく発達し、不規則に分枝するが断裂しない。基生菌糸から伸長した気菌糸は単純分枝し、長い孢子鎖を形成する。気菌糸の形は、直状、曲状または不完全なループ状でプリドハムら (Pridham, T.G., et al.: Appl. Microbiol. 6:54, 1958) 等の分類のRFまたはRAタイプに属する。1つの孢子連鎖は20個以上の孢子からなる。孢子は表面が平滑で、円筒型であった。孢子の

大きさは $0.5-0.7 \times 0.7-1.3 \mu\text{m}$ であった。菌核、孢子囊、遊走子は観察されなかった。

細胞壁タイプ

細胞壁のアミノ酸はベッカーら (Becker, B., M. P. Lechevalier, R. E. Gordon and H. A. Lechevalier: Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of whole-cell hydrolysates: Appl. Microbiol. 12:421-423, 1964)

山口 (Yamaguchi, T.: Comparison of the cell wall composition of morphologically distinct actinomycetes: J. Bacteriol. 89:444-453, 1965)

等の方法に従い、全菌体分解物の分析の結果、LL-シアミノピメリン酸の存在が確認できた。従って本菌株の細胞壁タイプは I 型と考えられる。

以上の形態観察および化学分析の結果から No. 6907 株はプリドハムら (Pridham, T. G. et al: Appl. Microbiol. 6:54, 1958) の分類に従えば、*Streptomyces* 属に属すると考えられる。そこで本菌株を文献、シャーリングら (Shirling, E. B. and D. Gottlieb: Cooperative discription of type culture of *Streptomyces*. 2. Spiecies descriptions from first study. Intern. J. Syst. Bacteriol. 18:69-189, 1968 ;
Shirling, E. B. and D. Gottlieb: Cooperative discription of type culture of *Streptomyces*. 3. Additional spiecies descriptions from first and second studies. Intern. J. Syst. Bacteriol. 18:279-392, 1968 ;
Shirling, E. B. and D. Gottlieb: Cooperative discription of type culture of *Streptomyces*. 4. Spiecies descriptions from second, third and forth studies. Intern. J. Syst. Bacteriol. 19:391-512, 1969) 、スカーマンら (Skerman, V. B., V. McGowan and P. H. A. Sneath: Approved list of bacterial names. Amended Edition. American Society for Microbiology, Washington, D. C., 1989、
および、ムーアら、 (Moore, W. E., E. P. Cato and L. V. H. Moore: Index of bacterial and Yeast Nomencultural Changes. American Society for

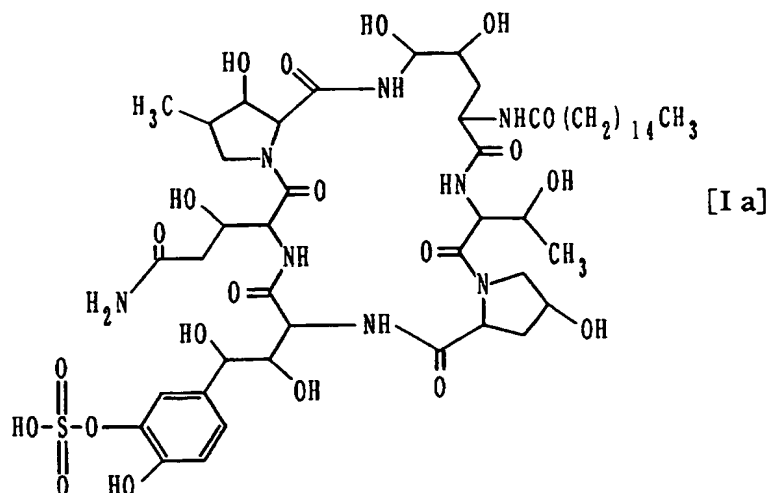
Microbiology, Washington, D. C., 1992)

に記載されたStreptomyces属の種と比較した。その結果、同種と判定できる種を見い出すことができなかったため、この菌株をStreptomyces sp. No. 6907と命名した。

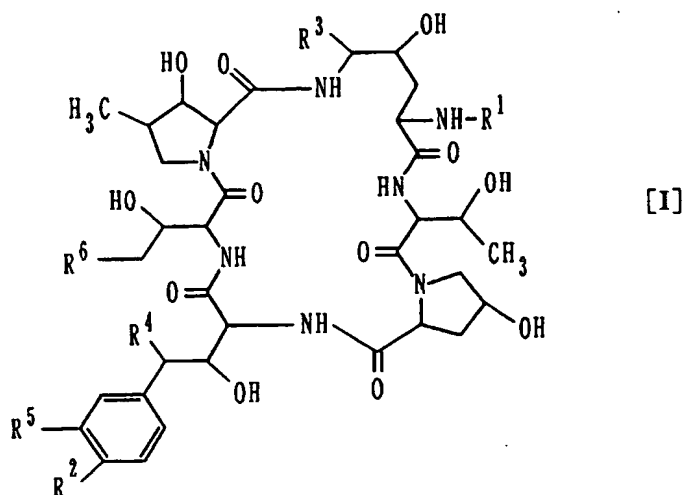
このStreptomyces sp. No. 6907株は通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所、(〒305 茨城県つくば市東1-1-3)にFERM P-15506として平成8年3月8日に寄託され、さらにFERM BP-5809として平成9年2月3日にブダペスト条約に基づく寄託へ移管されている。

この発明でいう「環状リポペプチド物質」とは、ポリペプチド環を有し、該環上に側鎖として、「アシルアミノ基」を有する物質をいい、この物質は、さらに他の側鎖を有していてもよい。

該「環状リポペプチド物質」の代表例であるFR901379物質は微生物Coleophoma sp. F-11899株(FERM BP-2635)によって生産される抗真菌活性を持った既知物質(特開平3-184921号公報に記載)であり、下記構造式[Ia]で示される化合物である。

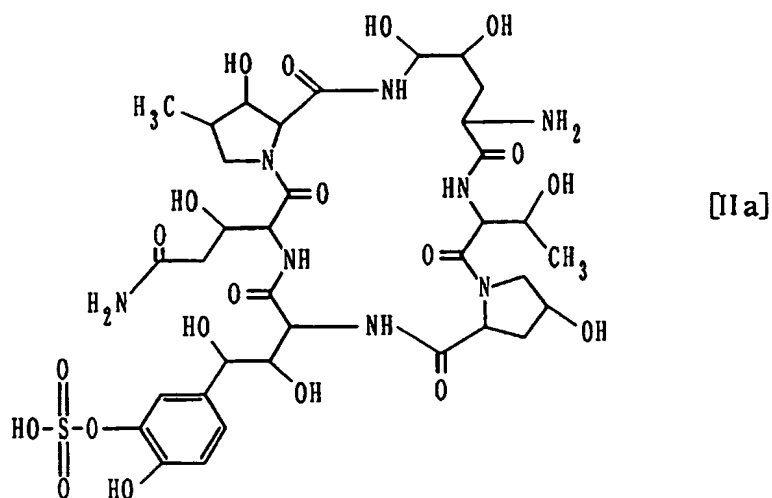


また、FR901379物質類似体とは、下記一般式[I]で示される化合物またはその塩をいう。

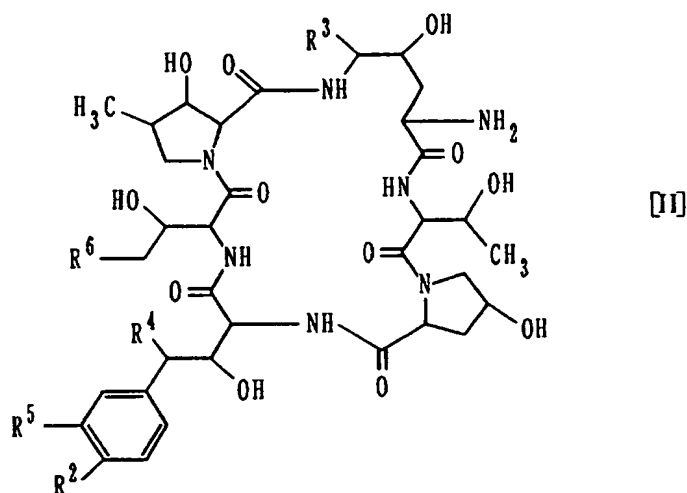


[式中、 R^1 はアシル基、
 R^2 はヒドロキシ基またはアシルオキシ基、
 R^3 は水素またはヒドロキシ基、
 R^4 は水素またはヒドロキシ基、
 R^5 は水素またはヒドロキシスルホニルオキシ基、および
 R^6 は水素またはカルバモイル基
を意味する]

この発明の新規環状リポペプチドアシラーゼは、*Streptomyces*属に属する菌由来のアシラーゼであって、環状リポペプチド物質の側鎖の「アシルアミノ基」を脱アシル化して、「アミノ基」へと導くものであり、具体的にはFR901379物質またはその塩のパルミトイル側鎖あるいはFR901379物質を含む前記一般式 [I] で示されるFR901379物質類似体またはその塩のアシル側鎖を脱アシル化して環状ペプチド物質、具体的には、下記構造式 [IIa] で示される化合物 (FR179642物質) またはその塩



あるいはFR179642物質を含む下記一般式 [II] で示されるFR179642類似体またはその塩



[式中、R²、R³、R⁴、R⁵ および R⁶ は前記と同じ基を意味する]
を生産させるアシラーゼである。

化合物 [I] および [II] の好適な塩は慣用の無毒性のモノまたはジ塩であって、金属塩、例えばアルカリ金属塩（例えばナトリウム塩、カリウム塩等）、アルカリ土類金属塩（例えばカルシウム塩、マグネシウム塩等）、アンモニウム塩、有機塩基との塩（例えば、トリメチルアミン塩、トリエチルアミン塩、ピリ

ジン塩、ピコリン塩、ジシクロヘキシルアミン塩、N, N' - ジベンジルエチレンジアミン塩等) 等、有機酸付加塩 (例えばギ酸塩、酢酸塩、トリフルオロ酢酸だ塩、マレイン酸塩、酒石酸塩、メタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、トルエンスルホン酸塩等)

無機酸付加塩 (例えば塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、硫酸塩、りん酸塩等)、アミノ酸 (例えばアルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸等) との塩等が挙げられる。

好適な「低級アルキル」としては1～6個の炭素原子を有する直鎖または分岐状アルキル、例えばメチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、tert-ブチル、ペンチル、イソペンチルおよびヘキシルが挙げられ、好ましくは1～4個の炭素原子を有するアルキルであり、さらに好ましくはメチルである。

好適な「高級アルキル」としては、ヘプチル、オクチル、3,5-ジメチルオクチル、3,7-ジメチルオクチル、ノニル、デシル、ウンデシル、ドデシル、トリデシル、テトラデシル、ペンタデシル、ヘキサデシル、ヘプタデシル、オクタデシル、ノナデシル、イコシルなどの、炭素原子数7～20の直鎖状または分枝鎖状のものが挙げられる。

好適な「低級アルコキシ」としては、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、イソプロポキシ、ブトキシ、イソブトキシ、第三級ブトキシ、ペンチルオキシ、第三級ペンチルオキシ、ネオペンチルオキシ、ヘキシルオキシ、イソヘキシルオキシなどの直鎖状または分枝鎖状のものが挙げられる。

好適な「高級アルコキシ」としては、ヘプチルオキシ、オクチルオキシ、3,5-ジメチルオクチルオキシ、3,7-ジメチルオクチルオキシ、ノニルオキシ、デシルオキシ、ウンデシルオキシ、ドデシルオキシ、トリデシルオキシ、テトラデシルオキシ、ヘキサデシルオキシ、ヘプタデシルオキシ、オクタデシルオ

キシ、ノナデシルオキシ、イコシルオキシなどの直鎖状または分枝鎖状のものが挙げられる。

好適な「アリール」としては、低級アルキルを有していてもよいフェニル（たとえばフェニル、メシチル、トリルなど）、ナフチル、アントリルなどが挙げられる。

好適な「アシルアミノ基」あるいは「アシル基」の「アシル」部分としては、カルボン酸、炭酸、カルバミン酸、スルホン酸などから誘導される脂肪族アシル、芳香族アシル、複素環アシル、アリール置換脂肪族アシルおよび複素環置換脂肪族アシルを挙げることができる。

上記「アシル」の好適な例としては、ハロゲン（たとえばフルオロ、クロロ、ブロモ、ヨード）、ヒドロキシ、上記高級アルコキシ、上記アリールなどの適当な置換基を1または2個以上（好ましくは1ないし3個）有していてもよいアリール（たとえばフェニル、ナフチル、アントリルなど）；上記低級アルコキシ；アミノ；保護されたアミノ〔好ましくはアシルアミノ、たとえば、低級アルコキシカルボニルアミノ（たとえば、メトキシカルボニルアミノ、エトキシカルボニルアミノ、プロポキシカルボニルアミノ、ブトキシカルボニルアミノ、*t*-ブトキシカルボニルアミノ、ペンチルオキシカルボニルアミノ、ヘキシルオキシカルボニルアミノ、など）など〕；ジ（低級）アルキルアミノ（たとえば、ジメチルアミノ、*N*-メチルエチルアミノ、ジエチルアミノ、*N*-プロピルブチルアミノ、ジペンチルアミノ、ジヘキシルアミノなど）；低級アルコキシイミノ（たとえば、メトキシイミノ、エトキシイミノ、プロポキシイミノ、ブトキシイミノ、*t*-ブトキシイミノ、ペンチルオキシイミノ、ヘキシルオキシイミノなど）；上記高級アルコキシなどの適当な置換基を1または2個以上（好ましくは1ないし3個）有していてもよいフェニル（低級）アルコキシイミノなどのアル（低級）アルコキシイミノ（たとえば、ベンジルオキシイミノ、フェネチルオキシイミノ、ベンズヒドリルオキシイミノなど）；高級アルキル（たとえば、ヘプチル、オクチル、2-エチルヘキシル、ノニル、デシル、3, 7-ジメチルオクチル、ウ

ンデシル、ドデシル、トリデシル、テトラデシル、ペンタデシル、3-メチル-10-エチルドデシル、ヘキサデシル、ヘプタデシル、オクタデシル、ノナデシル、イコシルなど)などの適当な置換基を1または2個以上(好ましくは1ないし3個)有していてもよい複素環チオ(好ましくは、ピリジルチオ);アミノ、上記保護されたアミノ、上記高級アルキルなどの適当な置換基を1または2個以上(好ましくは、1ないし3個)有していてもよい複素環基(たとえば、チエニル、イミダゾリル、ピラゾリル、フリル、テトラゾリル、チアゾリル、チアジアゾリルなど)などの適当な置換基を1または2個以上(好ましくは、1ないし3個)有していてもよい低級アルカノイル(たとえば、ホルミル、アセチル、プロピオニル、ブチリル、イソブチリル、バレリル、ヘキサノイル、ピバロイル、など);

高級アルカノイル(例えば、ヘプタノイル、オクタノイル、ノナノイル、デカノイル、ウンデカノイル、ラウロイル、トリデカノイル、ミリストイル、ペンタデカノイル、パルミトイル、10,12-ジメチルテトラデカノイル、ヘプタデカノイル、ステアロイル、ノナデカノイル、イコサノイルなど);

上記高級アルコキシなどの適当な置換基を1または2個以上(好ましくは1ないし3個)有していてもよい上記アリールなどの適当な置換基を1または2個以上(好ましくは1ないし3個)有していてもよい低級アルケノイル(たとえば、アクリロイル、メタクリロイル、クロトノイル、3-ペンテノイル、5-ヘキセノイルなど);

高級アルケノイル(たとえば、4-ヘプテノイル、3-オクテノイル、3,6-デカジエノイル、3,7,11-トリメチル-2,6,10-ドデカトリエノイル、4,10-ヘプタデカジエノイルなど);

低級アルコキシカルボニル(たとえば、メトキシカルボニル、エトキシカルボニル、プロポキシカルボニル、ブトキシカルボニル、t-ブトキシカルボニル、ベンチルオキシカルボニル、ヘキシルオキシカルボニルなど);

高級アルコキシカルボニル(たとえば、ヘプチルオキシカルボニル、オクチルオキシカルボニル、2-エチルヘキシルオキシカルボニル、ノニルオキシカルボニル、デシルオキシカルボニル、3,7-ジメチルオクチルオキシカルボニル、

ウンデシルオキシカルボニル、ドデシルオキシカルボニル、トリデシルオキシカルボニル、テトラデシルオキシカルボニル、ペンタデシルオキシカルボニル、3-メチル-10-エチルドデシルオキシカルボニル、ヘキサデシルオキシカルボニル、ヘプタデシルオキシカルボニル、オクタデシルオキシカルボニル、ノナデシルオキシカルボニル、イコシルオキシカルボニルなど）；

アリールオキシカルボニル（たとえば、フェノキシカルボニル、ナフチルオキシカルボニルなど）；

アリールグリオキシロイル（たとえば、フェニルグリオキシロイル、ナフチルグリオキシロイルなど）；

適当な置換基を1または2個以上有していてもよいアル（低級）アルコキシカルボニル、たとえば、ニトロまたは低級アルコキシを有していてもよいフェニル（低級）アルコキシカルボニル（たとえば、ベンジルオキシカルボニル、フェネチルオキシカルボニル、p-ニトロベンジルオキシカルボニル、p-メトキシベンジルオキシカルボニルなど）；

低級アルキルスルホニル（たとえば、メチルスルホニル、エチルスルホニル、プロピルスルホニル、イソプロピルスルホニル、ペンチルスルホニル、ブチルスルホニルなど）；

上記低級アルキル、上記高級アルコキシなどの適当な置換基を1または2個以上（好ましくは1ないし3個）有していてもよいアリールスルホニル（たとえば、フェニルスルホニル、ナフチルスルホニルなど）；

フェニル（低級）アルキルスルホニルなどのアル（低級）アルキルスルホニル（たとえば、ベンジルスルホニル、フェネチルスルホニル、ベンズヒドリルスルホニルなど）；

上記ハロゲン；低級アルキル（たとえば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、t-ブチル、ペンチル、ヘキシルなど）；上記高級アルキル；上記低級アルコキシ、上記ハロゲン、上記アリールなどの適当な置換基を1または2個以上（好ましくは1ないし10個）有していてもよい低級アルコキシ（たとえば、メトキシ、エトキシ、プロポキシ、ブトキシ、t-ブトキシ、ペンチルオキシ、ヘキシルオキシなど）；上記ハロゲンなどの適当な置換基を1または2個以上（好ま

しくは1ないし17個)有していてもよい高級アルコキシ(たとえば、ヘプチルオキシ、オクチルオキシ、2-エチルヘキシルオキシ、ノニルオキシ、デシルオキシ、3,7-ジメチルオクチルオキシ、ウンデシルオキシ、ドデシルオキシ、トリデシルオキシ、テトラデシルオキシ、ペンタデシルオキシ、3-メチル-10-エチルドデシルオキシ、ヘキサデシルオキシ、ヘプタデシルオキシ、オクタデシルオキシ、ノナデシルオキシ、イコシルオキシなど)；高級アルケニルオキシ(たとえば、3-ヘプテニルオキシ、7-オクテニルオキシ、2,6-オクタジエニルオキシ、5-ノネニルオキシ、1-デセニルオキシ、3,7-ジメチル-6-オクテニルオキシ、3,7-ジメチル-2,6-オクタジエニルオキシ、8-ウンデセニルオキシ、3,6,8-ドデカトリエニルオキシ、5-トリデセニルオキシ、7-テトラデセニルオキシ、1,8-ペンタデカジエニルオキシ、15-ヘキサデセニルオキシ、11-ヘプタデセニルオキシ、7-オクタデセニルオキシ、10-ノナデセニルオキシ、18-イコセニルオキシなど)；カルボキシ；上記高級アルコキシなどの適当な置換基を1または2個以上(好ましくは1ないし3個)有していてもよい上記アリアル；上記低級アルコキシもしくは上記高級アルコキシなどの適当な置換基を1または2個以上(好ましくは1ないし3個)有していてもよいアリアルオキシ(たとえば、フェノキシ、ナフチルオキシ、アントリルオキシなど)などの適当な置換基を1または2個以上(好ましくは1ないし5個)有していてもよいアロイル(たとえば、ベンゾイル、ナフトイル、アントリルカルボニルなど)；などを挙げることができる。

前記「アシル基」中、好ましいものは、高級アルカノイルであり、特に好ましいものはバルミトイル基である。

好適な「アシルオキシ基」中の「アシル基」は前記「アシル基」に対して例示したものを挙げることができる。

好適な「アシルオキシ基」は低級アルカノイルオキシ(たとえば、ホルミルオキシ、アセチルオキシ、プロピオニルオキシ、ブチリルオキシ、イソブチリルオキシ、バレリルオキシ、ヘキサノイルオキシ、ピバロイルオキシなど)あるいは

ホスホノオキシなどが挙げられる。

この発明の新規な環状リポペプチドアシラーゼは、例えば *Streptomyces anulatus* No.4811株 (FERM BP-5808)、*Streptomyces anulatus* No.8703株 (FERM BP-5810) あるいは、*Streptomyces* sp.No.6907株 (FERM BP-5809) のような *Streptomyces* 属に属するアシラーゼ生産菌株を培地中で培養することにより生産できる。

一般的には、この新規アシラーゼは、この新規アシラーゼ生産菌株が、同化しうる炭素源および窒素源を含有する水性培地中で、好ましくは例えば振とう培養、深部培養等の好気性条件下で培養することにより生産できる。

培地の好ましい炭素源としては、グルコース、キシロース、ガラクトース、グリセリン、スターチ、デキストリン等のような炭水化物が挙げられる。他の炭素源としてはマルトース、ラムノース、ラフィノース、アラビノース、マンノース、サリシン、コハク酸ナトリウム等が挙げられる。

好ましい窒素源としてはイースト・エキストラクト、ペプトン、グルテンミール、綿実粉、大豆粉、コーン・ステープ・リカー、乾燥イースト、小麦胚芽、羽毛粉、落花生粉等、ならびに例えば硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム、磷酸アンモニウム等のアンモニウム塩、尿素、アミノ酸等のような無機または有機窒素化合物が挙げられる。

炭素源および窒素源は好ましくはそれらの組合わせで使用されるが、適量の生育因子および相当量の無機栄養素を含有していれば純度の低い物質も使用でき、必ずしも純粋な形で使用する必要はない。所望により培地に炭酸ナトリウムまたは炭酸カルシウム、磷酸ナトリウムまたは磷酸カリウム、塩化ナトリウムまたは塩化カリウム、沃化ナトリウムまたは沃化カリウム、マグネシウム塩、銅塩、コバルト塩等の無機塩を添加してもよい。特に培養培地が著しく発泡する場合には、必要により液状パラフィン、脂肪油、植物油、鉱油またはシリコンのような消泡剤を添加してもよい。

この新規アシラーゼを大量生産する条件としては、深部好気培養が好ましい。少量生産にはフラスコまたはびん中で振とう培養または表面培養が行われる。さ

らにまた、大型タンク内で生育を実施する場合には、新規アシラーゼの生産工程における生育遅延を回避するために、微生物の前培養を用いて生産タンク中に菌を接種するのが好ましい。すなわち、比較的少量の培養培地に微生物の孢子または菌糸を接種し、その接種培地を培養して微生物の前培養接種物をまず生産し、次いで培養した前培養接種物を無菌的に大型タンクに移すのが望ましい。この前培養接種物を生産する培地は、新規アシラーゼの生産に使用される培地と実質的に同じであってもよく、また異なってもよい。

培養混合物の攪拌および通気は種々の方法で行うことができる。攪拌はプロペラまたはこれに準ずる攪拌装置を用いるか、醗酵器を回転させるかまたは振とうするか、種々のポンプ装置を用いるか、または培地中に滅菌空気を通すことによっても行うことができる。通気は滅菌空気を醗酵混合物中を通過させることにより行ってもよい。

醗酵は通常、約20℃～32℃の温度範囲、好ましくは25～30℃で、pHは6～8が好ましく、約50～150時間行われるが、醗酵条件および醗酵規模によって適宜変化させればよい。

このようにして生産された新規アシラーゼは、他の既知の生物学的活性物質の回収に通常使用される慣用の方法で培養培地から回収することができる。生産された新規アシラーゼは、培養菌糸中および汙液中に見出され、従って新規アシラーゼは、培養ブrossの汙過または遠心分離によって得られる菌糸および汙液から、減圧濃縮、凍結乾燥、常用の溶媒による抽出、pH調整、例えば陰イオン交換樹脂または陽イオン交換樹脂、非イオン性吸着樹脂等の常用の樹脂による処理、例えば活性炭、ケイ酸、シリカゲル、セルロース、アルミナ等の常用の吸着剤による処理、結晶化、再結晶化等の慣用の方法によって分離、精製することができる。

Streptomyces anulatus No.4811株、*Streptomyces anulatus* No.8703株、および *Streptomyces* sp.No.6907株によって生産されるアシラーゼについて具体的に説明するために以下実施例を挙げるが、この発明がそれらに限定されるものではない。

実施例 1 - 1

Streptomyces anulatus No.4811株が生産するアシラーゼの製造

コーンスターチ 1 %、グルコース 1 %、落花生粉 0.5 %、大豆粕 0.5 %、乾燥酵母 0.5 %、炭酸カルシウム 0.2 % の組成からなる種培地 30 ml を分注した 100 ml 三角フラスコを 120℃ で 20 分間滅菌し、*Streptomyces anulatus* No.4811 株の斜面寒天培養の 1 ~ 2 白金耳を接種し、30℃ で 3 日間振とう培養して種培養とした。

次いでシュクロース 4 %、落花生粉 1 %、乾燥酵母 1 %、リン酸二水素カリウム 0.05 %、リン酸水素二カリウム 0.12 %、硫酸マグネシウム 7 水和物 0.025 % の組成からなる生産培地の pH を 6.5 に調整し、この生産培地 100 ml を分注した 500 ml 三角フラスコを 120℃ で 20 分間滅菌し、これに前記種培養を 2 ml 接種して、30℃ で 3 日間振とう培養し酵素培養液とした。

実施例 1 - 2

Streptomyces anulatus No.8703株が生産するアシラーゼの製造

コーンスターチ 1 %、グルコース 1 %、落花生粉 0.5 %、大豆粕 0.5 %、乾燥酵母 0.5 %、炭酸カルシウム 0.2 % の組成からなる種培地 30 ml を分注した 100 ml 三角フラスコを 120℃ で 20 分間滅菌し、*Streptomyces anulatus* No.8703 株の斜面寒天培養の 1 ~ 2 白金耳を接種し、30℃ で 3 日間振とう培養して種培養とした。

次いでシュクロース 4 %、落花生粉 1 %、乾燥酵母 1 %、リン酸二水素カリウム 0.05 %、リン酸水素二カリウム 0.12 %、硫酸マグネシウム 7 水和物 0.025 % の組成からなる生産培地の pH を 6.5 に調整し、この生産培地 100 ml を分注した 500 ml 三角フラスコを 120℃ で 20 分間滅菌し、これに前記種培養を 2 ml 接種して、30℃ で 3 日間振とう培養し酵素培養液とした。

実施例 1 - 3

Streptomyces sp.No.6907株が生産するアシラーゼの製造

可溶性澱粉 6 %、脱脂大豆粉 4 %、炭酸カルシウム 0.5 % の組成からなる種培地 30 ml を分注した 100 ml 三角フラスコを 120℃ で 20 分間滅菌し、*Streptomyces* sp.No.6907 株の斜面寒天培養の 1 ~ 2 白金耳を接種し、30℃ で 3 日間振とう培養して

種培養とした。

次いでシュークロース 4 %、落花生粉 1 %、乾燥酵母 1 %、炭酸カルシウム 0.5 % の組成からなる生産培地の pH を 6.5 に調整し、この生産培地 100 ml を分注した 500 ml 三角フラスコを 120 °C で 20 分間滅菌し、これに前記種培養を 2 ml 接種して、30 °C で 4 日間振とう培養し酵素培養液とした。

実施例 1 - 4

Streptomyces 属に属する保存株が生産するアシラーゼの製造

(財) 醗酵研究所 (大阪市淀川区十三本町 2 - 17 - 85) から分譲された下記 *Streptomyces* 属に属する保存株についても実施例 1 - 1 と同様の方法により *Streptomyces anulatus* No. 4811 株と同様の酵素培養液を得ることができた。

Streptomyces griseus subsp. *griseus* IFO 13189

次にこの発明の新規環状リポペプチドアシラーゼを用いた環状リポペプチド抗真菌性物質 (例えば FR901379 物質及びその類似体) のアシル側鎖の脱アシル化法について詳しく説明する。

本発明の脱アシル化の実施は以下のようにして行うことができる。

適当な生産培地に *Streptomyces* 属に属し、新規アシラーゼを生産する微生物を接種し、約 25 ~ 35 °C で数日間振とう培養し、これを酵素培養液とする。この培養液を、基質としての FR901379 物質等の環状リポペプチド物質に添加し、45 ~ 60 °C、pH を約 6.0 ~ 9 に保ち、FR179642 物質等の環状ペプチド核を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によって検出し、分離する。

本発明の脱アシル化法について具体的に説明するために以下実施例を挙げるが、この発明がそれらに限定されるものではない。

実施例 2 - 1

実施例 1 - 1 で得た *Streptomyces anulatus* No. 4811 株の培養液 700 μ l に FR

901379物質の水溶液 (100mg/ml) 100 μ l (FR901379物質として10mg; 8.35 μ mol)、メタノール100 μ lおよび緩衝液 (0.5Mリン酸二水素カリウム-リン酸水素二ナトリウム緩衝液; pH6.0) 100 μ lを加え、30℃で30分間反応させた。反応終了後、4%酢酸1mlを添加して反応を終了させ、メタノール2mlを加え、メンブランフィルター (0.45 μ m) で濾過して高分子蛋白などを除去後、HPLCによって生成したFR179642物質を210nmでモニターしてアシラーゼ活性を測定した。

HPLCは波長可変UV検出器 (島津SPD-10A) およびポンプ (島津LC-10AD) およびインテグレータ (島津C-R6A) で構成し、固定相には、リクロスファー (LiChrospher) 100RP-18 (e) (250mm \times 4mm i.d.、粒径5 μ m) を使用し、3%アセトニトリル/0.5%リン酸二水素アンモニウムからなる移動相によって1ml/分の流速でFR179642物質を溶離させた。FR179642物質の保持時間は約6.3分であった。この結果に基づきFR179642物質の生成量を計算すると730 μ g (0.78 μ mol) であった。

実施例 2 - 2

実施例 1 - 2 で得た *Streptomyces anulatus* No.8703株の培養液700 μ lにFR901379物質の水溶液 (100mg/ml) 100 μ l (FR901379物質として10mg; 8.35 μ mol)、メタノール100 μ lおよび緩衝液 (0.5Mリン酸二水素カリウム-リン酸水素二ナトリウム緩衝液; pH6.0) 100 μ lを加え、30℃で30分間反応させた。反応終了後、4%酢酸1mlを添加して反応を終了させ、メタノール2mlを加え、メンブランフィルター (0.45 μ m) で濾過して高分子蛋白などを除去後、HPLCによって生成したFR179642物質を210nmでモニターしてアシラーゼ活性を測定した。

HPLCは波長可変UV検出器 (島津SPD-10A) およびポンプ (島津LC-10AD) およびインテグレータ (島津C-R6A) で構成し、固定相には、リクロスファー (LiChrospher) 100RP-18 (e) (250mm \times 4mm i.d.、粒径5 μ m) を使用し、3%アセトニトリル/0.5%リン酸二水素アンモニウムからなる移動相によって1ml/分の流速でFR179642物質を溶離させた。FR179642物質の保持時間は約6.3分であった。この結果に基づきFR179642物質の生成量を計算すると830 μ g (0.89

μmol)であった。

実施例 2 - 3

実施例 1 - 3 で得た *Streptomyces* sp. No. 6907 株の培養液 $700\mu\text{l}$ に FR901379 物質の水溶液 ($100\text{mg}/\text{ml}$) $100\mu\text{l}$ (FR901379 物質として 10mg ; $8.35\mu\text{mol}$)、メタノール $100\mu\text{l}$ および緩衝液 (0.5M リン酸二水素カリウム-リン酸水素二ナトリウム緩衝液; $\text{pH}6.0$) $100\mu\text{l}$ を加え、 30°C で 30 分間反応させた。反応終了後、4% 酢酸を添加して反応を終了させ、メタノール 2ml を加え、メンブランフィルター ($0.45\mu\text{m}$) で濾過して高分子蛋白などを除去後、HPLC によって生成した FR179642 物質を 210nm でモニターしてアシラーゼ活性を測定した。

HPLC は波長可変 UV 検出器 (島津 SPD-10A) およびポンプ (島津 LC-10AD) およびインテグレータ (島津 C-R6A) で構成し、固定相には、リクロスファー (LiChrospher) 100RP-18 (e) ($250\text{mm} \times 4\text{mm i.d.}$ 、粒径 $5\mu\text{m}$) を使用し、3% アセトニトリル / 0.5% リン酸二水素アンモニウムからなる移動相によって $1\text{ml}/\text{分}$ の流速で FR179642 物質を溶離させた。FR179642 物質の保持時間は約 6.3 分であった。この結果に基づき FR179642 物質の生成量を計算すると $560\mu\text{g}$ ($0.60\mu\text{mol}$) であった。Lineweaver-Burk 法によって決定した時の K_m 値は $257\mu\text{M}$ であり、 V_{max} は $14.3\text{U}/\text{mg-protein}$ であった。

実施例 2 - 4

実施例 1 - 3 で得た *Streptomyces* sp. No. 6907 株の培養液 $100\mu\text{l}$ に Aculeacin A のジメチルスルホキシド溶液 ($100\text{mg}/\text{ml}$) $100\mu\text{l}$ (Aculeacin A として 10mg ; $9.65\mu\text{mol}$)、 1.2MKCl を含む 500mM リン酸二水素カリウム-リン酸水素二ナトリウム緩衝液 ($\text{pH}7.0$) $500\mu\text{l}$ 、水 $300\mu\text{l}$ を加え、 40°C で 15 分間反応させた。4% 酢酸 1ml で反応を停止し、メタノール 2ml を添加後、メンブランフィルター ($0.45\mu\text{m}$) で濾過して高分子蛋白などを除去後、HPLC によって生成した Aculeacin

A 核物質を 210nm でモニターしてアシラーゼ活性を測定した。HPLC は波長可変 UV 検出器 (島津 SPD-10A) およびポンプ (島津 LC-10AD) およびインテグレータ (島津 C-R6A) で構成し、固定相にはリクロスファー (LiChrospher) 100RP-

18 (e) (4 mm×250mm i.d., 粒径 5 μ m (Merck)) を使用し、4 % アセトニトリル水 / 1 % リン酸二水素アンモニウムからなる移動相によって 1 ml / 分の流速で Aculeacin A 核物質を溶離させた。Aculeacin A 核物質の保持時間は約 8.7 分であった。この結果に基づき Aculeacin A 核物質の生成量を計算すると 370 μ g (0.47 μ mol) であった。Lineweaver-Burk 法によって決定した時の K_m 値は 279 μ M であり、 V_{max} は 16.8 U / mg-protein であった。

実施例 2 - 5

実施例 1 - 3 で得た *Streptomyces* sp. No. 6907 株の培養液に 100 μ l に Echinocandin B のジメチルスルホキシド溶液 (100mg / ml) 100 μ l (Echinocandin B とし 10mg ; 9.43 μ mol)、1.2MKCl を含む 500mM リン酸二水素カリウム-リン酸水素二ナトリウム緩衝液 (pH7.0) 500 μ l、水 300 μ l を加え、40℃ で 15 分間反応させた。4 % 酢酸 1 ml で反応を停止し、メタノール 2 ml を添加後、メンブランフィルター (0.45 μ m) で濾過して高分子蛋白などを除去後、HPLC によって生成した Echinocandin B 核物質を 210nm でモニターしてアシラーゼ活性を測定した。HPLC は波長可変 UV 検出器 (島津 SPD-10A) およびポンプ (島津 LC-10AD) およびインテグレータ (島津 C-R6A) で構成し、固定相にはリクロスファー (LiChrospher) 100RP-18(e) (4 mm×250mm i.d., 粒径 5 μ m (Merck)) を使用し、4 % アセトニトリル水 / 1 % リン酸二水素アンモニウムからなる移動相によって 1 ml / 分の流速で Echinocandin B 核物質を溶離させた。Echinocandin B 核物質の保持時間は約 8.7 分であった。この結果に基づき Echinocandin B 核物質の生成量を計算すると 90 μ g (0.11 μ mol) であった。Lineweaver-Burk 法によって決定した時の K_m 値は 146 μ M であり、 V_{max} は 7.85 U / mg-protein であった。

Streptomyces 属に属するこの発明の新規アシラーゼ生産菌が生産するアシラーゼによる環状リポペプチド抗真菌性物質 (例えば FR901379 物質) のアシル側鎖を脱アシル化する過程における特徴を以下に述べる。

なお、これらのデータは上の実施例 2 - 1、実施例 2 - 2 または実施例 2 - 3

で述べた実験方法を用いて、緩衝液の種類（0.5Mクエン酸ナトリウム緩衝液、0.5Mリン酸二水素カリウム－リン酸水素二ナトリウム緩衝液およびトリス・塩酸緩衝液を適宜組み合わせて使用）、反応温度、メタノールの添加濃度などを変更して得たものである。なお、それぞれのアシラーゼの活性は反応終了時のFR 179642物質の濃度（HPLCで測定）で示してある。

反応時の至適 p H

試験例 1 - 1 Streptomyces anulatus No.4811株
の生産するアシラーゼの至適pH

p H	反応終了後のFR179642物質の濃度 (μ g/ml)
3	0
4	9 0
5	4 4 0
6	6 3 0
6 . 5	7 1 0
7	7 7 0
8	8 1 0
9	7 4 0

試験例 1 - 2 Streptomyces anulatus No.8703株
の生産するアシラーゼの至適pH

p H	反応終了後のFR179642物質の濃度 (μ g/ml)
3	0
4	2 4 0
5	5 9 0
6	8 1 0
7	1 . 0 7 0
8	1 . 3 0 0
9	1 . 2 7 0

試験例 1 - 3 Streptomyces sp. 6907株の
生産するアシラーゼの至適pH

p H	反応終了後のFR179642物質の濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
3	0
4	1 9 0
5	2 8 0
6	3 0 0
7	4 7 0
8	8 0 0
9	1, 0 0 0

以上の結果は、本発明の実施にあたっては、いずれのアシラーゼについても反応は弱酸性（pH 4 付近）以上で反応が進行し、pHが高くなるほど反応速度が上昇することを示している。

反応時の至適温度

試験例 2 - 1 Streptomyces anulatus No.4811株
の生産するアシラーゼの至適温度

温度	反応終了後のFR179642物質の濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
25	3 6 0
30	6 3 0
40	1, 4 9 0
50	3, 1 2 0
60	1, 1 1 0
70	6 0

試験例 2 - 2 *Streptomyces anulatus* No.8703株
の生産するアシラーゼの至適温度

温度	反応終了後のFR179642物質の濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
25	4 1 0
30	7 7 0
40	1 . 7 6 0
50	3 . 1 6 0
60	2 . 1 1 0
70	1 2 0

試験例 2 - 3 *Streptomyces* sp. No.6907株の
生産するアシラーゼの至適温度

温度	反応終了後のFR179642物質の濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
25	6 0 0
30	7 1 0
40	3 . 0 1 0
50	4 . 6 2 0
60	1 . 6 6 0
70	1 3 0

以上の結果は、本発明の実施にあたっては、いずれのアシラーゼについても反応時の至適温度は40ないし60℃であることを示している。

反応時のメタノール添加の効果

試験例 3 - 1 *Streptomyces anulatus* No.4811株
の生産するアシラーゼで反応させた
場合のメタノール効果

メタノール濃度 (%)	反応終了後のFR179642物質の濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
0	3 9 0
5	5 7 0
1 0	6 3 0
1 5	5 9 0
2 0	5 5 0
3 0	3 9 0
4 0	1 3 0
5 0	1 0

試験例 3 - 2 *Streptomyces anulatus* No.8703株
の生産するアシラーゼで反応させた
場合のメタノール効果

メタノール濃度 (%)	反応終了後のFR179642物質の濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
0	3 2 0
5	5 8 0
1 0	7 7 0
1 5	7 5 0
2 0	6 6 0
3 0	3 6 0
4 0	1 4 0
5 0	5 0

試験例 3 - 3 Streptomyces sp. No.6907株の生産
するアシラーゼで反応させた場合の
メタノール効果

メタノール濃度 (%)	反応終了後のFR179642物質の濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
0	3 3 0
5	5 8 0
1 0	7 1 0
1 5	6 3 0
2 0	5 3 0
3 0	1 4 0
4 0	1 3 0
5 0	9 0

以上の結果は、本発明の実施にあたっては、いずれのアシラーゼについても、5ないし20%のメタノールが反応液中に存在すると活性は1.6ないし2.2倍に上昇することを示している。

次にStreptomyces属に属するアシラーゼ生産菌を培養して得られる環状リポペプチドアシラーゼについて具体的に説明する。

・ Streptomyces sp.6907株由来のアシラーゼの特徴

1) 作用：

FR901379及びEchinocandin B, Aculeacin A等のFR901379物質類似体に代表される環状リポペプチド物質の脂質アシル部分の脱アシル化を触媒する。

2) 至適pH：pH 8 ～ 9

3) 作用適温の範囲：50℃付近

4) 阻害、活性化及び安定化:

メタノール: 反応液中の含量が10%までは濃度依存的に活性化され、それ以上は阻害される。

5) 分子量:

精製した本酵素をSDS-PAGEにかけたところ2つのバンドに別れた。

ラーシペプチド ; 61kD

スモールペプチド ; 19kD

6) 結晶構造:

精製されたタンパク量が少なく、結晶になっていない。

7) アミノ酸分析:

N末端アミノ酸配列

ラーシペプチド ;

Ser-Asn-Ala-Val-Ala-Phe-Asp-Gly-Ser-Thr-Thr-Val-Asn-Gly-Arg-
Gly-Leu-Leu-Leu-Gly-...

スモールペプチド ;

Gly-Ser-Gly-Leu-Ser-Ala-Val-Ile-Arg-Tyr-Thr-Glu-Tyr-Gly-Ile-
Pro-His-His-Val-Ala-...

8) 基質特異性:

FR901379、Echinocandin B及び Aculeacin Aに対しては触媒作用を持っている。しかしFR901469に対しては作用を持たない。

本発明のアシラーゼについて具体的に説明するために以下実施例を挙げるが、この発明がそれらに限定されるものではない。

アシラーゼの精製:

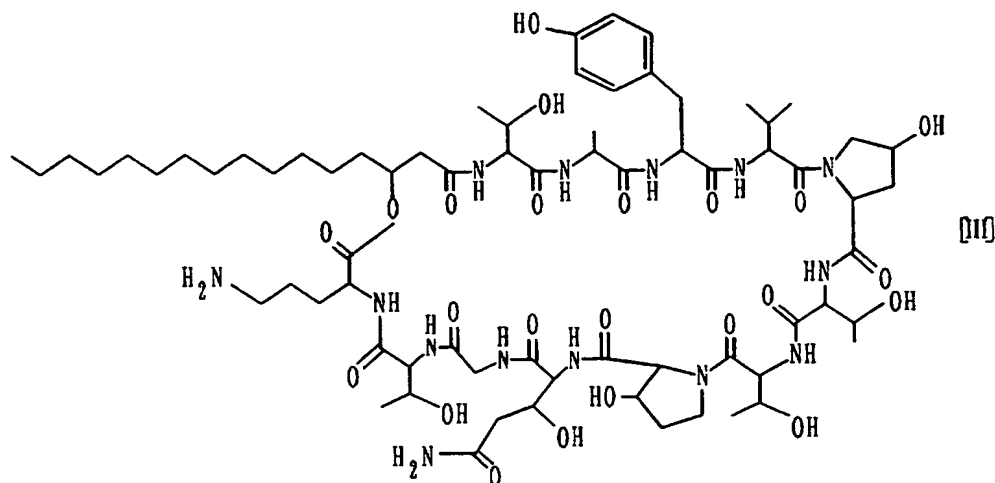
実施例 3

実施例 1 - 3 で得た *Streptomyces* sp. No. 6907株の培養液を、低温下、1.5M KClで攪拌抽出し、No. 2 濾紙にて得られた抽出液をUF膜（旭化成 ; AIP-1010）にて脱塩（20mM トリス-塩酸緩衝液（pH 9）に置換）し、HP-20カラムにパス

させた。得られたパス液をDEAE-Toyopearlカラム (Cl⁻型)に通液し、0.3M NaClを含む20mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 9) で溶出した。活性画分に (NH₄)₂SO₄ を0.5M相当量添加溶解してPhenyl-Toyopearlカラムに通液し、0.1M NaClを含む50mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8) で溶出した。得られた活性画分をDF膜 (旭化成; SIP-0013) で脱塩濃縮 (20mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 9) に置換) し、YMC-Diolカラムにてゲル濾過を行い (移動相; 0.2M NaClを含む0.1M リン酸二水素カリウム-リン酸水素二ナトリウム緩衝液 pH7.0)、さらに活性画分を逆相系のCosmosil 5 C 4-AR-300カラムにて分取精製を行った (移動相; (A液) 0.5% トリフルオロ酢酸、(B液) 0.5% トリフルオロ酢酸-80%アセトニトリル、A : B = 60 : 40 → 40 : 60 (直線グラジエント))。この精製したアシラーゼをSDS-PAGEにかけたところ、2つのバンドに分かれた。これより分子量 61kDと19kDの2種類のペプチドを取得した。

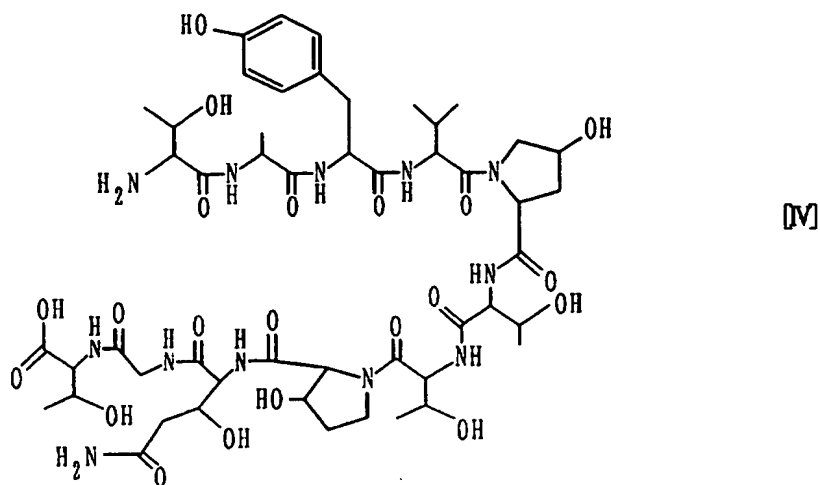
基質特異性:

FR901469物質はカビNo. 11243株 (FERM BP-3373) によって生産される抗真菌活性を持った既知物質 (W092/19648号公報に記載) であり、下記構造式 [III] :



で示される化合物である。

この発明の新規アシラーゼと同様な脱アシル作用を持つ *Actinoplanes utahensis* 由来のアシラーゼ（特開平 4 - 228072号公報に記載）は前記化合物 FR901469物質またはその塩に対して触媒活性を示し、下記構造式 [IV]：



で示される FR181131物質（W096/30399号公報に記載）を生産させる。

それに対して、この発明の新規アシラーゼは上記化合物 FR901469物質またはその塩に対して触媒活性を示さない。

以下実施例を挙げる。

実施例 4 - 1

Actinoplanes utahensis IF0 13244を J. Antibiotics, Vol. 41, p1085-1092 ('88) の記載に準じ培養した液 20ml に FR901469物質の水溶液 (200mg/ml) 1 ml (FR901469物質として 0.2 g ; 130 μ mol)、リン酸二ナトリウム 2.9 g、水 60ml を加え、60℃ で 24 時間反応させた。反応終了後、反応液をメンブランフィルター (0.45 μ m) で濾過して高分子蛋白などを除去後、HPLC によって生成し FR181131 物質を 210nm でモニターしてアシラーゼ活性を測定した。HPLC は波長可変 UV 検出器 (島津 SPD-10A) およびポンプ (島津 LC-10AD) およびインテグレータ (島津 C-R6A) で構成し、固定相には YMC AM303 (4 mm \times 250mm i.d. 粒径 5 μ m) を使用し、12.5% アセトニトリル水 / 0.5% リン酸二水素アンモニウムからなる移動

相によって1 ml/分の流速でFR181131物質を溶離させた。FR181131物質の保持時間は約7.3分であった。この結果に基づきFR181131物質の生成量を計算すると80 mg (68 μ mol) であった。

実施例 4 - 2

実施例 1 - 3 で得られた *Streptomyces* sp. No. 6907 株の培養液 20 ml に FR901469 物質の水溶液 (200 mg/ml) 1 ml (FR901469 物質として 0.2 g ; 130 μ mol)、リン酸二ナトリウム 2.9 g、水 60 ml を加え、60℃ で 24 時間反応させた。反応終了後、反応液をメンブランフィルター (0.45 μ m) で濾過して高分子蛋白などを除去後、HPLC によって生成した FR181131 物質を 210 nm でモニターしてアシラーゼ活性を測定した。HPLC は波長可変 UV 検出器 (島津 SPD-10A) およびポンプ (島津 LC-10AD) およびインテグレーター (島津 C-R6A) で構成し、固定相には YMC AM303 (4 mm \times 250 mm i.d. 粒径 5 μ m) を使用し、12.5% アセトニトリル水 / 0.5% リン酸二水素アンモニウムからなる移動相によって 1 ml/分の流速で FR181131 物質を溶離させた。FR181131 物質の保持時間は約 7.3 分であった。この結果に基づき FR181131 物質の生成量を計算すると 2 mg (1.7 μ mol) 以下 (検出限界以下) であった。

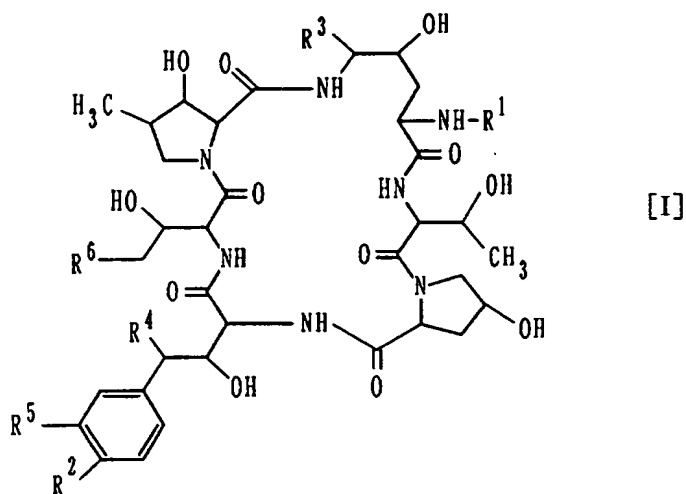
FR901379 物質を生産する *Coleophoma* sp. F-11899 株および本発明のアシラーゼを生産する *Streptomyces anulatus* No. 4811 株、*Streptomyces anulatus* No. 8703 株および *Streptomyces* sp. No. 6907 株は通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所 (茨城県つくば市東 1-1-3) に寄託されている。

<u>微生物</u>	<u>寄託番号</u>
<i>Coleophoma</i> sp. F-11899 株	FERM BP-2635
<i>Streptomyces anulatus</i> No. 4811 株	FERM BP-5808
<i>Streptomyces anulatus</i> No. 8703 株	FERM BP-5810
<i>Streptomyces</i> sp. No. 6907 株	FERM BP-5809
No. 11243 株	FERM BP-3373

請求の範囲

1. Streptomyces属に属する菌由来の環状リポペプチドアシラーゼ。

2. 一般式 [I] :



[式中、 R^1 はアシル基、

R^2 はヒドロキシ基またはアシルオキシ基、

R^3 は水素またはヒドロキシ基、

R^4 は水素またはヒドロキシ基、

R^5 は水素またはヒドロキシスルホニルオキシ基、および

R^6 は水素またはカルバモイル基

を意味する]

で示される環状リポペプチド物質またはその塩の R^1 のアシル基の脱アシル化を触媒し、一般式 [II] :



40

求の範囲第1項のアシラーゼ。

8. 次の性質を有する請求の範囲第1項のアシラーゼ

1) 作用:

FR901379及びEchinocandin B, Aculeacin A等のFR901379物質類似体に代表される請求の範囲第1項の環状リボペプチド物質の脂質アシル部分の脱アシル化を触媒する。

2) 至適pH: pH 8 ~ 9

3) 作用適温の範囲: 50℃付近

4) 阻害、活性化及び安定化:

メタノール: 反応液中の含量が10%までは濃度依存的に活性化され、それ以上は阻害される。

5) 分子量:

ラージペプチド ; 61kD

スモールペプチド ; 19kD

6) アミノ酸分析:

N末端アミノ酸配列

ラージペプチド ;

Ser-Asn-Ala-Val-Ala-Phe-Asp-Gly-Ser-Thr-Thr-Val-Asn-Gly-Arg-
Gly-Leu-Leu-Leu-Gly-...

スモールペプチド ;

Gly-Ser-Gly-Leu-Ser-Ala-Val-Ile-Arg-Tyr-Thr-Glu-Tyr-Gly-Ile-
Pro-His-His-Val-Ala-...

7) 基質特異性:

FR901379、Echinocandin B及び Aculeacin Aに対しては触媒作用を持っている。しかしFR901469に対しては作用を持たない。

9. アシラーゼ生産菌がStreptomyces sp. No.6907株であることを特徴とする請求の範囲第8項のアシラーゼ。

10. 請求の範囲第1項のアシラーゼを生産するStreptomyces属に属するアシラーゼ生産菌。

11. 請求の範囲第1項のアシラーゼを生産するStreptomyces anulatusに属する生産菌。

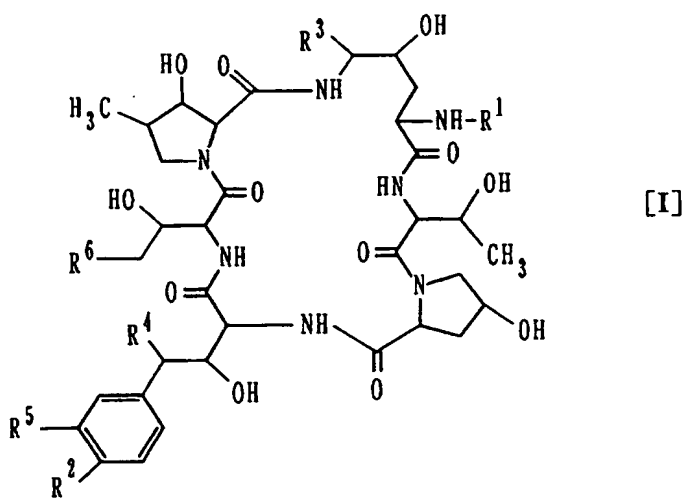
12. Streptomyces anulatus No.4811。

13. Streptomyces anulatus No.8703。

14. Streptomyces sp. No.6907。

15. 環状リポペプチド物質またはその塩を生産菌がStreptomyces属であるアシラーゼの粗または精製酵素液と接触させて、脂質アシル部分を脱アシル化することによる環状ペプチド物質またはその塩の製造法。

16. 一般式 [I] :

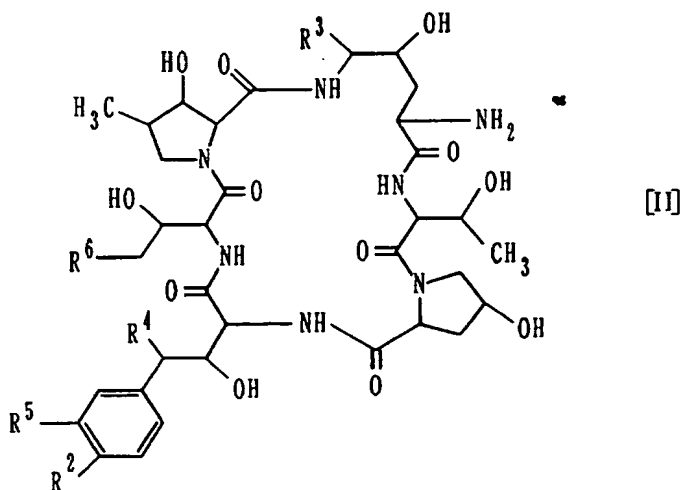


[式中、R¹ はアシル基、

R² はヒドロキシ基またはアシルオキシ基、

R³ は水素またはヒドロキシ基、
 R⁴ は水素またはヒドロキシ基、
 R⁵ は水素またはヒドロキシスルホニルオキシ基、および
 R⁶ は水素またはカルバモイル基
 を意味する]

で示される環状リポペプチド物質またはその塩を水性溶媒中、*Streptomyces*属に
 属するアシラーゼ生産菌を培養して得られるアシラーゼの粗または精製酵素液と
 接触させることを特徴とする一般式 [II] :



[式中、R²、R³、R⁴、R⁵ および R⁶ は前記と同じ基を意味する]

で示される環状ペプチド物質またはその塩の製造法。

17. 請求の範囲第16項の式中において

R⁵ はヒドロキシスルホニルオキシ基、および

R⁶ はカルバモイル基

であることを特徴とする請求の範囲第16項の製造法。

18. アシラーゼ生産菌が *Streptomyces anulatus* であることを特徴とする請求の
 範囲第15項の製造法。

19. アシラーゼ生産菌が*Streptomyces anulatus* No.4811であることを特徴とする請求の範囲第15項の製造法。

20. アシラーゼ生産菌が*Streptomyces anulatus* No.8703であることを特徴とする請求の範囲第15項の製造法。

21. アシラーゼ生産菌が*Streptomyces* sp. No.6907であることを特徴とする請求の範囲第15項の製造法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/00692

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. C1 ⁶ C12N9/80 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int. C1 ⁶ C12N9/80 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) BIOSIS PREVIEWS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, 4-228072, A (Eli Lilly and Co.), August 18, 1992 (18. 08. 92) & EP, 460882, A & CA, 2043762, A & HU, 61587, T & TW, 197471, A & IL, 98349, A & DE, 69121018, A1 & ES, 2089133, T3 & US, 5573936, A	1 - 21
A	L.D. Boeck and R.W. Wetzel "A54145, A New Lipopeptide Antibiotic Complex: Factor Control Through Precursor Directed Biosynthesis" The Journal of Antibiotics, 1990, Vol. 43, No. 6, p. 607-615	1 - 21
A	D.S. Fukuda et al. "A54145, A New Lipopeptide Antibiotic Complex: Microbial and Chemical Modification" The Journal of Antibiotics, 1990, Vol. 43, No. 6, p. 601-606	1 - 21
A	L.D. Boeck et al. "Deacylation of A21978C, An Acidic Lipopeptide Antibiotic Complex, By Actinoplanes Utahensis" The Journal of	1 - 21
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search May 21, 1997 (21. 05. 97)		Date of mailing of the international search report June 3, 1997 (03. 06. 97)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP97/00692

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	Antibiotics, 1988, Vol. 41, No. 8, p. 1085-1092	
A	Manuel Debono et al. "Enzymatic and Chemical Modification of Lipopeptide Antibiotic A21978C: The Synthesis and Evaluation of Daptomycin" The Journal of Antibiotics, 1988, Vol. 41, No. 8, p. 1093-1105	1 - 21
A	Junji Inokoshi et al. "Cloning and sequencing of the aculeacin A acylase-encoding gene from Actinoplanes utahensis and expression in Streptomyces lividans" Gene, 1992, Vol. 119, No. 1, p. 29-35	10 - 14

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 97/00692

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C 12 N 9/80

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C 12 N 9/80

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS PREVIEWS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	J P, 4-228072, A (イーライ・リリー・アンド・カンパニー) 18. 8月. 1992 (18. 08. 92) & EP, 460882, A & CA, 2043762, A & HU, 61587, T & TW, 197471, A & IL, 98349, A & DE, 69121018, A1 & ES, 2089133, T3 & US, 5573936, A	1-21
A	L. D. Boeck and R. W. Wetzel "A54145. A New Lipopeptide Antibiotic Complex : Factor Control Through Precursor Directed Biosynthesis " The Journal of Antibiotics, 1990, vol. 43, no. 6, p. 607-615	1-21

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

21. 05. 97

国際調査報告の発送日

03.06.97

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

富永 みどり

印

4 B

9152

電話番号 03-3581-1101 内線 3449

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	D. S. Fukuda et al. "A54145, A New Lipopeptide Antibiotic Complex : Microbial and Chemical Modification " The Journal of Antibiotics , 1990, vol. 43, no. 6, p. 601-606	1 - 2 1
A	L. D. Boeck et al. "Deacylation of A21978C, An Acidic Lipopeptide Antibiotic Complex . By Actinoplanes Utahensis " The Journal of Antibiotics , 1988, vol. 41, no. 8, p. 1085-1092	1 - 2 1
A	Manuel Debono et al. "Enzymatic and Chemical Modification of Lipopeptide Antibiotic A21978C: The Synthesis and Evaluation of Daptomycin " The Journal of Antibiotics , 1988, vol. 41, no. 8, p. 1093-1105	1 - 2 1
A	Junji Inokoshi et al. "Cloning and sequencing of the aculeacin A acylase-encoding gene from Actinoplanes utahensis and expression in Streptomyces lividans" Gene, 1992, vol. 119, no. 1, p. 29-35	1 0 - 1 4